



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Patentschrift**  
⑩ **DE 41 16 727 C 2**

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 12 N 5/08**  
C 12 N 5/06  
C 12 M 3/06

②1 Aktenzeichen: P 41 16 727.9-41  
②2 Anmeldetag: 17. 5. 91  
④3 Offenlegungstag: 19. 11. 92  
④5 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 7. 9. 95

DE 41 16 727 C 2

Inn rhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦3 Patentinhaber:  
Marx, Uwe, Dr., 12629 Berlin, DE; Hausdorf, Gert,  
Dr., 10369 Berlin, DE

⑦4 Vertreter:  
Linser, H., Pat.-Anw., 63303 Dreieich

⑦2 Erfinder:  
Marx, Uwe, Dr., O-1152 Berlin, DE; Hausdorf, Gert,  
Dr., O-1156 Berlin, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

EP 02 30 223 A2  
SU 15 94 211  
SU 15 49 993  
SU 12 96 576

31:3059 Biosis;  
Chemical Abstracts 115: 112774e;  
Chemical Abstracts 114: 4860a;  
Chemical Abstracts 107: 234669e;

⑤4 Verfahren und Vorrichtung zur gleichzeitigen Kultivierung unterschiedlicher Säugerzellen

DE 41 16 727 C 2

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Kultivierung von Zellen in einem Bioreaktor. Die Anwendungsgebiete des der Erfindung zugrunde liegenden Bioreaktors sind die medizinisch angewandte

5 Forschung sowie die pharmazeutische Industrie.

Um Säugerzellen effizient in vitro kultivieren zu können, müssen die Kulturbedingungen den in vivo Bedingungen weitgehend angepaßt sein. Neben konstantem pH-Wert und konstanter Temperierung sind hier unter anderem eine optimale Nährstoffversorgung, eine angepaßte Sauerstoffversorgung, Zell-Zell-Kontakt, eine gleichmäßige Abfuhr von Stoffwechselprodukten und eine Zelltrümmerbeseitigung entscheidend. Diesen Anforderungen kommen Kultursysteme, in denen der extrakapilläre Raum von Dialysekulturgefäßen (z. B. Hohlfaser-

10 patronen) als Kulturraum für die Zellen benutzt wird, am nächsten. Solche Dialysekulturgefäße sind in den verschiedensten Variationen beschrieben worden (US-PS 4220 725, 4391 912, 4647 539; DE-PS 24 31 450). Permanent wachsende Zelllinien und proliferierende Primärzellen können in derartigen Kulturgefäßen aufgrund der guten Ver- und Entsorgung annähernd Gewebezellichten erreichen, wodurch Zellverbände mit spezifischem optimalen Mikroklima entstehen. Im Kulturraum lassen sich dadurch hohe Konzentrationen der Zellprodukte (rekombinante Proteine, monoklonale Antikörper, Wachstumsfaktoren u. a.) erreichen. Diese Pro-

15 dukte können dann aus den Zellkulturen gewonnen werden. Die auf diesen Kulturgefäßen basierenden Bioreaktoren sind für die Massenkultivierung jeweils eines Zelltyps (permanente Zelllinie, proliferierende Primärgewebe u. ä.) optimiert. Das Funktionsprinzip der Dialysekulturgefäße machte ihren Einsatz als Organersatz (künstliche Niere) in der Medizin möglich.

20 Aus der EP 230 223 A2 ist ein Verfahren zur Perfusionskultivierung bekannt, dessen Kulturkammereinheiten, die sich auf eine einheitliche Zellart beziehen, nicht in Wechselwirkung miteinander treten können. Diese sind mit einer gaspermeablen Wand bzw. einem Gasabscheider versehen, wodurch Kulturkammereinheit und Begasungskreislauf getrennt werden.

25 Ein weiterer organmodellierender Bioreaktor wird z. B. in der US-PS 4 242 460 in Form eines Pankreasmodells vorgeschlagen. Zellkulturvorrichtungen, in denen mehrere derartige Kulturmodule in einem gemeinsamen Versorgungskreislauf integriert sind und in denen die Porengröße der den Versorgungskreislauf und die Kulturräume trennenden Membran variierbar ist, sind bisher nicht beschrieben worden.

30 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Kulturvorrichtung zu entwickeln, mit deren Hilfe zum einen relevante Produkte aus verschiedenen Säugerzellen in einem Kulturansatz hergestellt und zum anderen die biologische Einflüsse verschiedenartiger Säugerzellen (Primärzellen, Gewebe u. a.) aufeinander im Sinne von Organwechselwirkungen auf humoraler Ebene untersucht werden können.

35 Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß unterschiedliche Säugerzellen gleichzeitig in mehreren separaten Kulturgefäßen in einen gemeinsamen Versorgungskreislauf gebracht und die Säugerzellen in den separaten Gefäßen kultiviert werden und der zell-besiedelte Raum jedes separaten Kulturgefäßes durch in der Porengröße variierbare zell-rückhaltende Membranen vom Versorgungskreislauf getrennt ist.

40 Als separate Kulturgefäße finden mehrere Module, wie Hohlfasermodule, Verwendung und die Säugerzellen — wie Primärsäugerzellen, Gewebestrukturen von Säugern, entartete Säugerzellen, permanent wachsende Säugerzelllinien oder gentechnisch modifizierte Säugerzellen bzw. -zelllinien — die zum Sezernieren, Freisetzen oder Umsetzen von Zellprodukten oder Interaktionsfaktoren befähigt sind, werden in zell-besiedelten Räumen kultiviert.

In Weiterbildung der Erfindung werden die Zellprodukte in den zell-besiedelten Räumen angereichert und/oder separat gewonnen.

45 Die Interaktionsfaktoren werden vorteilhaft in Abhängigkeit von ihren Eigenschaften auf das jeweils gleichzeitig kultivierte Gefäß übertragen und rufen dort definierte biologische Wirkungen hervor.

Die Kulturgefäße mit Primärzellen und Gewebestrukturen werden nach der Erfindung als in vitro-Organmodelle verwendet, die in ihrer gegenseitigen Beeinflussung Organwechselwirkungen auf humoraler Ebene nachvollziehen.

50 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung zur Kultivierung von Zellen, bestehend aus einem kontrolliert mit Frischmedium beschickbaren Konditionierungsgefäß, einem Oxygenator und einer zum Flußrichtungswechsel befähigten Pumpe. Die zell-besiedelten Räume separater Kulturgefäße, die gemäß der Erfindung mit unterschiedlichen Säugerzellen bestückt sind, sind parallel bzw. in Reihe geschaltet in einen Versorgungskreislauf integriert und die zell-besiedelten Räume der Kulturgröße sind durch in der Porengröße variable Membranen unabhängig, vom Versorgungskreislauf miteinander verbunden.

55 Die biophysikalischen Parameter im System werden bei Zu- und Abschalten einzelner Kulturgefäße durch Bypass-Module konstant gehalten.

Die Erfindung wird anhand der Zeichnung näher erläutert. Hierbei zeigt

Fig. 1 eine schematische Darstellung der Vorrichtung nach der Erfindung;

60 Fig. 2 eine schematische Darstellung einer Mikrofiltrationsmembran, welche unabhängig vom Versorgungskreislauf mit zell-besiedelten Kulturräumen anderer Module in Verbindung steht, und

Fig. 3 die vergrößerte schematische Darstellung einer Fasermembran.

65 Der durch den interkapillären Raum der Module verlaufende Versorgungskreislauf besteht gemäß Fig. 1 aus einem temperierten Konditionierungsgefäß 1, einem Oxygenator 2 und einer Zirkulationspumpe 3. In das Konditionierungsgefäß wird dosiert Frischmedium zugeführt 4 und verbrauchtes Medium aus ihm abgeführt 5. Mittels Oxygenator 2 wird das Medium mit Sauerstoff versorgt 6. Die Pumpe gewährleistet eine ständige Medienzirkulation mit gleichgerichteter oder periodisch wechselnder Flußrichtung im Versorgungskreislauf. Die einzelnen Module (z. B. 7 und 9) sind in Reihe oder parallel geschaltet in den Kreislauf integriert und können durch Ventile (x) separat zu- bzw. abgeschaltet werden. Jedem zur Kultivierung vorgesehenen Hohlfasermodul

kann ein Bypass-Modul (z. B. 8 zu 7 und 10 zu 9) zugeschaltet werden. Der zell-besiedelte Raum der Module 12 ist durch eine zell-rückhaltende Membran vom Versorgungskreislauf 13 getrennt. Er kann des weiteren über eine Mikrofiltrationsmembran 11 unabhängig vom Versorgungskreislauf mit zell-besiedelten Kulturräumen anderer Module in Verbindung stehen. Die Porengröße der Fasermembran 14 in den Modulen wird je nach Aufgabenstellung im Bereich von weniger als 1000 Dalton bis über 0,2 Mikrometer variiert (Fig. 3). Bei der Herstellung von Zellprodukten im zell-besiedelten Raum werden Dialysemembranen mit sehr geringen Porengrößen, auf alle Fälle aber kleiner als die zu gewinnenden Zellprodukte, eingesetzt. Bei der Modellierung von Organwechselwirkungen auf humoraler Ebene wird eine für wichtige Interaktionsfaktoren (Mediatoren, Wachstumsfaktoren, Stoffwechselprodukte u. a.) permeable Membran gewählt.

Unter "Säugerzellen" im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden Primärsäugerzellen, Gewebestrukturen von Säugern, entartete Säugerzellen, permanent wachsende Säugerzelllinien oder gentechnisch modifizierte Säugerzellen bzw. -zelllinien verstanden. Unter "Kulturgefäßen" im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden alle in vitro-Kulturgefäße verstanden, in denen der von den Säugerzellen besiedelte Raum durch eine zell-rückhaltende Membran vom Versorgungskreislauf getrennt ist.

Unter "Bypass-Modul" im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden alle Gefäße und Konstruktionen verstanden, welche die biophysikalischen Parameter des durch das jeweilige Bypass-Modul zu ersetzenden Kulturgefäßes simulieren können.

Unter "Zellprodukten" im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden alle von den Säugerzellen selbständig produzierten und für die Medizin oder Forschung nutzbaren Stoffe verstanden, z. B. Antikörper, Hormone, Faktoren, Enzyme, rekombinante Protein oder andere Stoffwechselprodukte.

Unter "Interaktionsfaktoren" im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden alle von den kultivierten Zellen sezernierten, freigesetzten und umgesetzten Stoffe, Faktoren, Bestandteile und andere Stoffwechselprodukte — unabhängig von ihrer Art und Herkunft — verstanden, wobei die Sezernierung, Freisetzung bzw. die Umsetzung unter den verschiedensten Bedingungen erfolgen kann. Unter "Organwechselwirkungen auf humoraler Ebene" im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden alle durch die Interaktionsfaktoren hervorgerufenen gegenseitigen Beeinflussungen der Säugerzellen in den einzelnen Kulturgefäßen verstanden.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht die gleichzeitige Kultivierung verschiedenartiger Säugerzellen, wie z. B. Primärzellen, Gewebestrukturen und permanente Zelllinien, in Kulturgefäßen, z. B. Hohlfasern eines Bioreaktors, wobei die unterschiedlichen Zelltypen jeweils in dem extrakapillären Raum eines Moduls kultiviert werden, indem die Module parallel oder in Reihe geschaltet in einen gemeinsamen oxigenierten Versorgungskreislauf integriert werden. Durch Variation der Porengröße der die Kulturräume und den Versorgungskreislauf abtrennenden Membran können Zellprodukte in den extrakapillären Räumen separat zurückgehalten, darin produziert und daraus isoliert werden. Des weiteren können durch entsprechende Veränderung der Porengröße Interaktionsfaktoren in den Versorgungskreislauf eingebracht werden. Dadurch ist die gegenseitige Beeinflussung der verschiedenartigen Säugerzellen über den gemeinsamen Versorgungskreislauf als Modell von Organwechselwirkungen auf humoraler Ebene möglich.

Mit der vorliegenden Erfindung wird der medizinischen Forschung und der Biotechnologie ein universelles Kultursystem zur Verfügung gestellt, in dem einerseits relevante Produkte aus verschiedenen Säugerzellen in einem Kultursystem gleichzeitig, aber voneinander getrennt, hergestellt und andererseits die biologischen Einflüsse verschiedenartiger Säugerzellen aufeinander im Sinne von Organwechselwirkungen auf humoraler Ebene untersucht werden können.

#### Ausführungsbeispiel

##### Eingesetzte Zelllinien:

- (A) — Mensch-Maus-Heterohybridom
- (B) — murines Hybridom

##### Produkt:

- (A) — humaner monoklonaler IgM-Antikörper
- (B) — muriner monoklonaler IgG-Antikörper

##### Medium:

Basalmedienmischung 1 : 1 IMEM und Ham's F12 für den Versorgungskreislauf

Basalmedienmischung (s. oben) sowie 2,5% FCS und 2 g/l Humanserumalbumin für die Zellkulturräume

##### Kulturbedingungen:

pH 7,0, pO<sub>2</sub> — 70% Luftsättigung, Temperatur 37°C, Medienzirkulationsgeschwindigkeit — 700 ml/min

#### Aufbau

In den Versorgungskreislauf eines CELL-PHARM-1-Bioreaktors wurden zwei parallel geschaltete DiaCap 12-Dialysehohlfasermodule mit einer effektiven Filterfläche von 1,2 m<sup>2</sup> eingebaut. In die extrakapillären Räume der Module wurden unabhängig voneinander je 10<sup>8</sup> Zellen der Hybridome (A) und (B) eingimpft. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 27 Tagen. An 10 Tagen wurden separate Produkternten aus den extrakapillären Räumen vorgenommen. Die Proben wurden auf die Vitalität der ausgeschwemmten Zellen, die Antikörperproduktion und die Kontamination mit dem jeweils anderen Antikörper untersucht. Des weiteren wurden periodisch Proben aus dem gemeinsamen Versorgungskreislauf auf die Anwesenheit der Antikörper

untersucht. Für die Antikörperquantifizierung wurden ELISA-Techniken und die HPLC-Affinitätschromatographie eingesetzt.

## Ergebnisse

Es traten weder Antikörper im gemeinsamen Versorgungskreislauf auf, noch waren Antikörperkreuzkontaminationen in den Zellbesiedelten Räumen nachzuweisen. Dadurch war eine separate Gewinnung der einzelnen Antikörper möglich. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Untersuchungsergebnisse aufgeführt.

| Kulturzeit<br>(Tage) |        | 7         | 11 | 13 | 15 | 17 | 19 | 21 | 23 | 25 | 27 |
|----------------------|--------|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                      |        | :         | :  | :  | :  | :  | :  | :  | :  | :  | :  |
| 15                   | M      | hIgM      | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
|                      | O      |           |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 20                   | D      | mIgG      | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                      | U      |           |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 25                   | L      | Vitalität | *  | *  | 53 | 69 | 83 | 90 | 78 | 93 | 87 |
|                      | (A)    | (%)       | :  | :  | :  | :  | :  | :  | :  | :  | :  |
| 30                   | M      | hIgM      | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                      | O      |           |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 35                   | D      | mIgG      | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
|                      | U      |           |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 40                   | L      | Vitalität | *  | *  | 77 | 70 | 84 | 75 | 80 | 63 | 70 |
|                      | (B)    | (%)       | :  | :  | :  | :  | :  | :  | :  | :  | :  |
| 45                   |        | hIgM      | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                      | Kreis- |           |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 50                   | lauf   | mIgG      | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
|                      |        |           |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Tab.1: Analysen der Proben aus den Zell-besiedelten Räumen ((A)-Heterohybridom, (B)-murines Hybridom) und aus dem Versorgungskreislauf auf Anwesenheit der beiden Antikörper und Vitalität der ausgeschwemmten Zellen

\* = nicht ermittelt, + = positiver Befund, - = negativer Befund

hIgM = Nachweis von humanem IgM

mIgG = spezifischer Nachweis des murinen Antikörpers

## Verwendete Bezugszeichen

Fig. 1: Schema des Kultursystems

- 1 Konditionierungsgefäß
- 2 Oxygenator
- 3 Zirkulationspumpe
- 4 Zufuhr von Frischmedium
- 5 Abfuhr von verbrauchtem Medium
- 6 Sauerstoffzufuhr
- 7 Modul

- 8 Bypass-Modul
- 9 wie 7
- 10 wie 8
- X Ventile

Fig. 2: Modul-Schema mit Mikrofiltrationsmembran

- 11 Mikrofiltrationsmembran
- 12 Zell-besiedelter Raum
- 13 Versorgungskreislauf

5

Fig. 3: Vergrößerter Auszug aus Fig. 2

- 14 Membran (schematisch)

10

### Patentansprüche

1. Verfahren zur gleichzeitigen Kultivierung von Zellen in einem Bioreaktor, dadurch gekennzeichnet, daß unterschiedliche Säugerzellen gleichzeitig in mehreren separaten Kulturgefäßen in einen gemeinsamen Versorgungskreislauf gebracht und die Säugerzellen in den separaten Gefäßen kultiviert werden und der zell-besiedelte Raum jedes separaten Kulturgefäßes durch in der Porengröße variierbare zell-rückhaltende Membranen von dem Versorgungskreislauf getrennt ist. 15
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als separate Kulturgefäße mehrere Module, wie Hohlfasermodule, Verwendung finden und die Säugerzellen — wie Primärsäugerzellen, Gewebestrukturen von Säugern, entartete Säugerzellen, permanent wachsende Säugerzelllinien oder gentechnisch modifiziert Säugerzellen bzw. -zelllinien — die zum Sezernieren, Freisetzen oder Umsetzen von Zellprodukten oder Interaktionsfaktoren befähigt sind, in Zell-besiedelten Räumen kultiviert werden. 20
3. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Zellprodukte in den zell-besiedelten Räumen angereichert und/oder separat gewonnen werden. 25
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Interaktionsfaktoren in Abhängigkeit von ihren Eigenschaften auf das jeweils gleichzeitig kultivierte Gefäß übertragen werden und dort definierte biologische Wirkungen hervorrufen. 30
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1, 2 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Kulturgefäße mit Primärzelllinien und Gewebestrukturen als in vitro-Organmodelle verwendet werden, die in ihrer gegenseitigen Beeinflussung Organwechsel-Wirkungen auf humoraler Ebene nachvollziehen. 35
6. Vorrichtung zur Kultivierung von Zellen, bestehend aus einem kontrolliert mit Frischmedium beschickbaren Konditionierungsgefäß, einem Oxigenator und einer zum Flußrichtungswechsel befähigten Pumpe, dadurch gekennzeichnet, daß zell-besiedelte Räume separater Kulturgefäße, die mit unterschiedlichen Säugerzellen bestückt sind, parallel bzw. in Reihe geschaltet in einen Versorgungskreislauf integriert sind und die zell-besiedelten Räume der Kulturgefäße durch in der Porengröße variierbare Membranen unabhängig vom Versorgungskreislauf miteinander verbunden sind. 40
7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Kulturgefäße einzeln zu- und abschaltbar sind. 45
8. Vorrichtung nach den Ansprüchen 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die biophysikalischen Parameter im System bei Zu- und Abschalten einzelner Kulturgefäße durch Bypass-Module konstant gehalten werden. 50

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

45

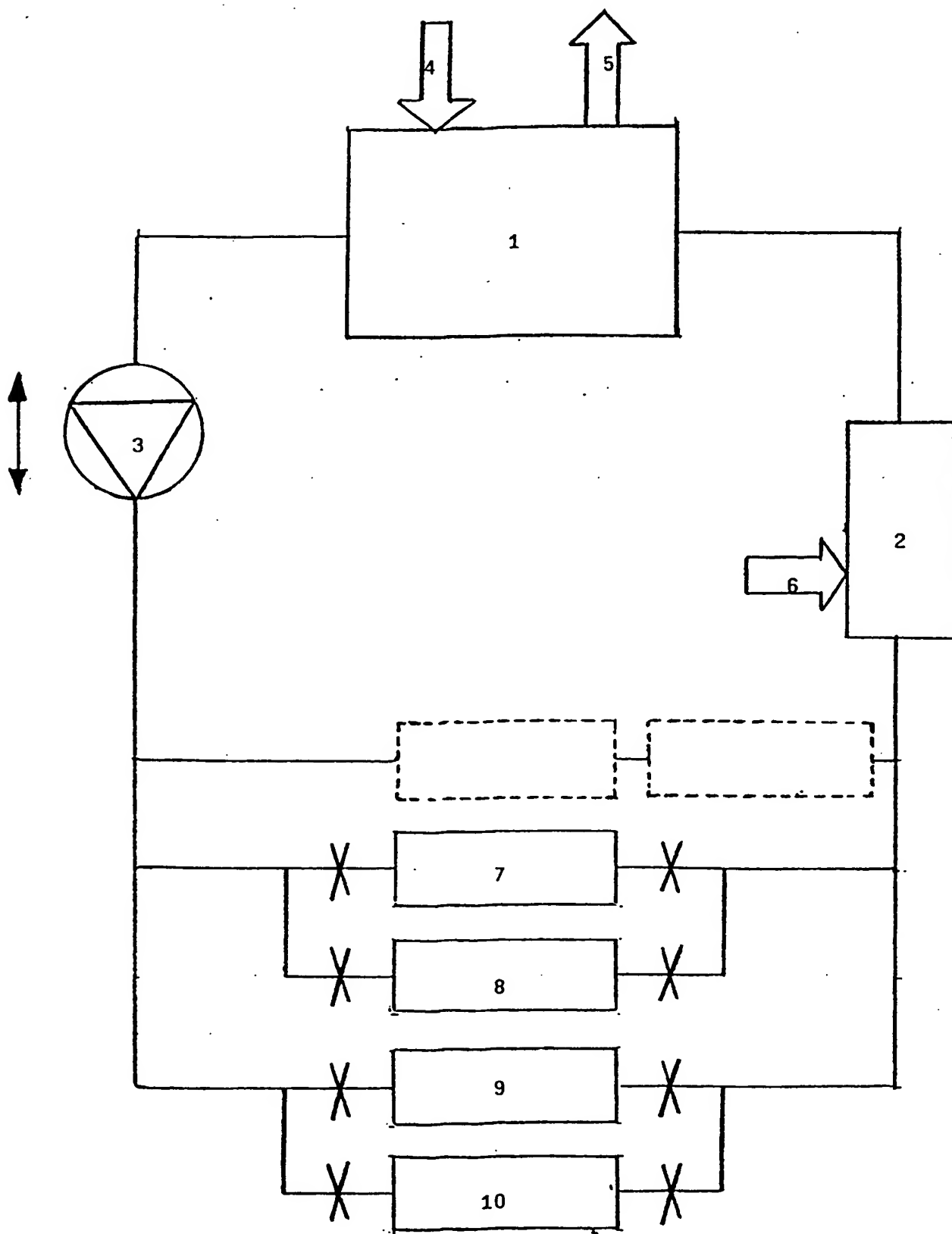
50

55

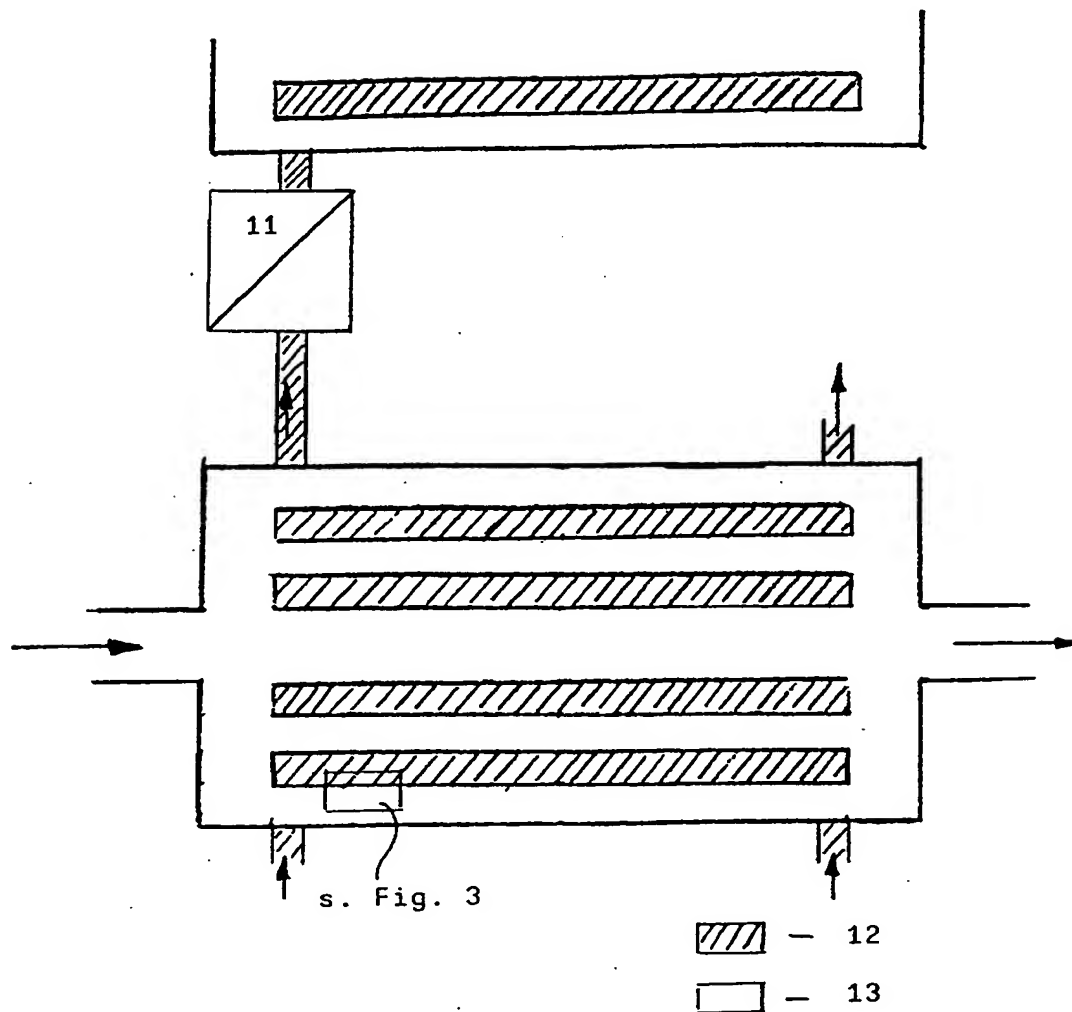
60

65

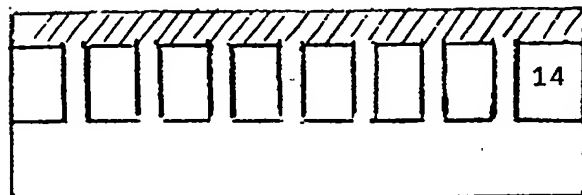
- Leerseite -



Figur 1



Figur 2



Figur 3